

UJI EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK (*ANNONA MURICATA* L.) TERHADAP ATEROSKLEROSIS ARTERI KORONER BURUNG PUYUH JANTAN

Zet Rizal², Surya Dharma¹, Rusmayanti²

¹Fakultas Farmasi, Universitas Andalas (UNAND), Padang

²Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi (STIFARM), Padang

ABSTRACT

Has been research about influence of ethanol extract of leaves of soursop (*Annona muricata* L.) on the formation of coronary artery atherosclerosis of male quail induced high fat feeding and propylthiourasil. Male quail were divided into five groups, each group getting treatment. Negative controls given standard diet, a positive control was given high fat feeding and propylthiourasil, doses of 50, 100, 200 mg / kg BW ethanol extract administered orally soursop leaves. The treatment is done for 60 day, then take heart, be making preparations histopathology and staining haematoxyllin-eosin. The results showed that the ethanol extract of leaves of soursop dose 50 mg / kg BW selective in preventing atherosclerosis in male quail, when compared with the positive control ($P < 0.05$). While the administration at a dose of 100 and 200 mg / kg showed no selective in preventing atherosclerosis in male quail, when compared with the positive control .

Keywords: Extract leaves, *Annona muricata*, atherosclerosis

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap aterosklerosis arteri koroner burung puyuh jantan yang diinduksi dengan makanan lemak tinggi (MLT) dan propiltiourasil. Burung puyuh jantan dibagi menjadi lima kelompok, masing-masing kelompok mendapatkan perlakuan. Kontrol negatif diberikan makanan standar, kontrol positif diberikan makanan lemak tinggi dan propiltiourasil, dosis 50, 100, 200 mg/kg BB diberikan ekstrak etanol daun sirsak secara oral. Perlakuan dilakukan selama 60 hari, kemudian jantung diambil, dilakukan pembuatan preparat histopatologi dan pewarnaan haematoxyllin-Eosin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun sirsak dosis 50 mg/kg BB selektif dalam mencegah terjadinya aterosklerosis pada burung puyuh jantan, jika dibandingkan dengan kontrol positif ($P < 0,05$). Sedangkan pemberian dengan dosis 100 dan 200 mg/kg BB menunjukkan tidak selektif dalam mencegah terjadinya aterosklerosis pada burung puyuh jantan, jika dibandingkan dengan kontrol positif .

Kata kunci: Ekstrak daun, *Annona muricata*, aterosklerosis.

PENDAHULUAN

Sejak dulu tanaman yang ada di Indonesia sudah menjadi bahan penelitian dan kajian yang mendalam dari pakar dunia. Penelitian terhadap berbagai tanaman yang berkhasiat terus dilakukan. Salah satu kekayaan alam Indonesia adalah tanaman Sirsak, tanaman ini termasuk jenis tanaman tropis yang bersifat tahunan. Selain diambil manfaat buahnya tanaman sirsak juga bisa dijadikan bahan pengobatan (Hasnawati, 2012).

Dari hasil penelitian yang terpercaya bahwa tanaman sirsak telah

terbukti sebagai antiprotozoa (Osorio *et al.*, 2007), antivirus herpes simplex (Padma, *et al.*, (1999), antihipertensi (Nwokocha, *et al.*, 2012). Dari penelitian lain juga telah dibuktikan bahwa daun sirsak memiliki aktivitas anti inflamasi (Sausa, *et al.*, 2010), antikanker (George, *et al.*, 2012), mengobati penyakit parkinson (Champy, *et al.*, 2005) dan dapat menurunkan kadar kolesterol pada tikus (Posangi, *et al.*, 2012) sedangkan buah sirsak telah dibuktikan sebagai antidepresi (Hasrat *et al.*, 1997).

Kandungan kimia dari tanaman sirsak (*Annona muricata* L.) adalah

alkaloid, saponin, tannin, flavonoid, tripenoid, Steroid. Dan terdapat senyawa-senyawa bioaktif bernama *annonaceous acetogenin* yang berhasil dilakukan analisa kualitatif (Gajalakshmi, *et al.*, 2011).

Aterosklerosis adalah deposit plak yang mengandung kolesterol, lemak, jaringan fibrosa, kolagen, kalsium, debris selular dan kapiler yang terbentuk dalam tunika intima dan tunika media arteri besar dan sedang. Aterosklerosis juga dapat diartikan sebagai kekakuan arteri karena timbunan lemak (plak) didalam lapisan tunika intima pembuluh darah, plak ini dapat menyebabkan lumen pembuluh darah menjadi sempit sehingga aliran darah kurang lancar, plak pada dinding pembuluh darah yang dapat memudahkan pembentukan bekuan darah. Bekuan darah ini menyumbat pembuluh darah secara total dan akan menyebabkan aterosklerosis (Price & Wilson, 1995).

Penulis tertarik untuk meneliti efek ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap aterosklerosis pada burung puyuh jantan. Diharapkan ekstrak etanol daun sirsak ini bekerja menurunkan kadar lemak terhadap aterosklerosis pada arteri koroner burung puyuh jantan sehingga bermanfaat sebagai vasodilator (pelebaran pembuluh darah) pada kasus penyakit kardiovaskular.

Adapun metoda yang dipakai dalam penelitian ini adalah metoda histopalogi dan parameter yang diamati adalah mengukur ketebalan dinding arteri, diameter lumen arteri koroner, mengamati tingkat kerusakan sel endothelia setelah di induksi dengan makanan lemak tinggi dan propylthiourasil.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah botol maserasi, seperangkat alat destilasi vakum, rotary evaporator (IKA RV 10), timbangan analitik (Ohaus), timbangan hewan, kandang hewan, lumpang dan stamfer, jarum oral, spatel, beaker glass

(Pyrex), pipet tetes, alat-alat bedah (gunting, pinset, kapas), kaca arloji, cover glass, kaca objek, inkubator, rotary microtom (Thermo), mikroskop (Olympus BX 51. DP2- BSW (DP 20)).

Bahan yang digunakan adalah daun sirsak, etanol 70 %, etanol 96 %, etanol 100 %, aquadest, Na CMC (Natrium carbo methyl cellulosa), NaCl (Natrium chloride) fisiologis 0,9 %, makanan standar burung puyuh, makanan lemak tinggi, propiltiourasil, formalin buffer 20 %, zat warna HE (Haematoxyllin Eosin), xylol, mayer's albumin (putih telur dan gliserin), aseton, paraffin cair, paraffin keras (murni) dan perekat etellan.

Prosedur Kerja

Identifikasi tanaman gaharu

Identifikasi tanaman dilakukan di Herbarium ANDA jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang.

Pengambilan sampel daun gaharu

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun sirsak (*Annona muricata* L.) segar sebanyak 2,4 kg yang didapat dari Alai Padang.

Pembuatan Ekstrak

Daun sirsak segar yang telah dicuci dan bersih dari kotoran dirajang kemudian dikeringkan anginkan hingga kadar air dibawah 10%, simplisia daun sirsak dimaserasi menggunakan pelarut yang sesuai. Gunakan pelarut yang dapat menyari sebagian besar metabolit sekunder yang terkandung dalam serbuk simplisia. digunakan etanol 70 % .

Masukkan 150 g simplisia kedalam botol maserasi, tambahkan 1,5 liter etanol 70% dibutuhkan 8 liter untuk 1.200 g simplisia. Rendam selama 6 jam pertama sambil sekali-sekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Pisahkan maserat dengan cara pengendapan, sentrifugasi, dekantasi atau filtrasi. Ulangi proses

penyarian sekurang-kurang dua kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Kumpulkan semua maserat, kemudian uapkan dengan penguap vakum atau penguap tekan rendah hingga diperoleh ekstrak kental (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008).

Hewan

Hewan uji dibagi atas 5 kelompok. Setiap kelompok terdiri dari 3 ekor. Sebelum perlakuan, hewan percobaan terlebih dahulu diaklimatisasi di laboratorium selama 1 minggu dengan diberi makanan standar yang cukup. Hewan percobaan dalam penelitian ini adalah burung puyuh jantan dengan berat 100-150 gram yang berumur 2-3 bulan, sehat dan tidak mengalami penurunan berat badan lebih dari 10% (Vogel, 2002).

Pembuatan suspensi ekstrak daun sirsak

Siapkan larutan Na CMC 0,5 % dengan cara: 0,5 gram Na CMC ditaburkan diatas air panas sebanyak 20 kalinya di dalam lumpang panas biarkan selama ± 15 menit kemudian digerus sampai larutan menjadi bening, lalu tambahkan ekstrak daun sirsak yang sudah ditimbang sesuai dengan dosis yang direncanakan ke dalam lumpang kemudian gerus hingga homogen. Setelah tersuspensi dengan baik cukupkan volumenya dengan penambahan aquadest 100 ml.

Pembuatan makanan lemak tinggi

Makanan lemak tinggi (MLT) merupakan penginduksi yang digunakan pada burung puyuh jantan, diberikan setiap hari. Setiap pembuatan lima kg MLT terdiri dari lemak sapi 1 kg, makanan standar burung puyuh 4 kg dan kuning telur ayam 4 butir. Makanan lemak tinggi dibuat dengan cara lemak sapi dipanaskan hingga mencair, ditambahkan makanan standar burung puyuh diaduk merata, kemudian ditambahkan kuning telur ayam sampai permukaan lemak tinggi ini homogen (Vogel 2002).

Pembuatan suspensi PTU

Dosis PTU untuk manusia dewasa 100 mg, untuk burung puyuh $100 \times 0,018 = 1,8 \text{ mg} / 200 \text{ gram BB}$. Diberikan setiap hari secara oral.

Larutan Na CMC 0,5 % disiapkan dengan cara: 0,5 gram Na CMC ditaburkan diatas air panas sebanyak 20 kalinya di dalam lumpang panas biarkan selama ± 15 menit sampai mengembang, kemudian masukan propylthiourasil digerus sampai homogen hingga terbentuk suspensi dan ditambahkan air suling hingga volume 100 ml.

Perencanaan dosis

Dari ekstrak daun sirsak yang diberikan kepada hewan percobaan secara per oral adalah 50 mg/kg BB, 100 mg/kg BB, 200 mg/kg BB.

Uji aterosklerosis pada arteri koroner burung puyuh

Tabel I. Pengelompokan burung puyuh berdasarkan perlakuan yang diberikan:

Perlakuan	Bentuk Perlakuan
Kelompok/ Dosis	
Kontrol Negatif	Makanan Standar
Kontrol Positif	MLT + PTU
50 mg/kg BB	MLT + PTU + Ekstrak daun sirsak
100 mg/kg BB	MLT + PTU + Ekstrak daun sirsak
200 mg/kg BB	MLT + PTU + Ekstrak daun sirsak

Pemberian ekstrak daun sirsak, makanan lemak tinggi dan propiltiourasil pada burung puyuh diberikan secara oral setiap hari selama 2 bulan. Dengan jarak waktu pemberian selama 1 jam setelah pemberian makanan lemak tinggi. Setelah perlakuan selama 2 bulan, hewan percobaan dikorbankan dengan cara di diskolasi lehernya kemudian lakukan operasi sayatan memanjang pada bagian garis tengah perut sampai dada, lalu isi rongga perut dipindahkan ke bagian kanan dengan menggunakan segumpal kapas sehingga jantung dapat terlihat jelas, kemudian organ jantung, hati, ginjal dipisahkan dari jaringan ikat dengan menggunakan pinset lalu ditimbang. Organ jantung yang diambil digunakan untuk pemeriksaan lesi aterosklerosis.

Pemeriksaan lesi aterosklerosis pada arteri jantung burung puyuh

a. Pembuatan preparat histopatologi

Pembuatan preparat histopatologi dengan menggunakan metoda paraffin yaitu: (Leeson, 1989).

1. Organ jantung dari burung puyuh yang dibedah dicuci terlebih dahulu dengan larutan NaCl (Natrium chloride) fisiologis 0,9 %.
2. Fiksasi dengan larutan formalin 10 % selama 3 jam.
3. Dehidrasi secara berurutan dengan alkohol 70 %, 95 %, 100 % masing-masing selama 1 jam.
4. Lakukan proses clearing dengan xylol sebanyak 2 kali, masing-masing selama 1 jam.
5. Infiltrasi kedalam paraffin cair selama 2 jam dan inkubasi selama 3,5 jam dalam inkubator pada suhu 56-60 °C.
6. Lakukan proses embedding yaitu menanamkan jaringan kedalam cetakan dengan media paraffin murni.
7. Jaringan yang telah ditanam dibuat balok pada kayu kemudian potong dengan menggunakan rotary mikrotom setebal 5µm. Ditempel pada kaca objek yang sebelumnya telah diberi perekat mayer's albumin (putih telur dan

glyserin), kemudian kering anginkan (Leeson, 1989).

8. Potongan yang berbentuk pita jaringan diletakkan pada waterbatch yang berisi air pada suhu maksimum 40 °C.

b. Pewarnaan preparat dengan warna haematoxyllin-eosin

1. Sayatan yang telah dilekatkan pada kaca objek di deparafinisasi dengan xylol sebanyak 2 kali selama 5 menit.
2. Rehidrasi dengan alkohol 100 %, 96 %, 70 % masing-masing selama 2 menit.
3. Cuci dengan air mengalir.
4. Warnai dengan haematoxyllin selama 2 menit.
5. Cuci dengan air mengalir sampai bersih.
6. Celupkan kedalam larutan HCl (Asam chloride) 0,4 N sebanyak 2-3 celupan.
7. Cuci dengan air mengalir.
8. Warnai dengan eosin selama 5 menit.
9. Dehidrasi dengan alkohol 70 %, 95 %, 100 % masing-masing selama 2 menit.
10. Clearing dengan menggunakan xylol sebanyak 2 kali, masing-masing selama 2 menit setelah itu dikeringkan anginkan.
11. Lakukan proses mounting yaitu dengan memberikan perekat etellan pada preparat dan menutupnya dengan cover glass.
12. Amati dibawah mikroskop (Leeson, 1989).

c. Pemeriksaan lesi aterosklerosis

1. Pemeriksaan diameter lumen arteri koroner

Diameter lumen arteri koroner diukur pada 3 titik yang dapat mewakili diameter arteri koroner secara keseluruhan kemudian dirata-ratakan.

2. Penilaian tingkat kerusakan sel endothelia arteri koroner

Penilaian dilakukan dengan mengamati kerusakan pada sel endothelia dan terjadi atau tidaknya proliferasi sel otot polos arteri koroner. Kemudian diberi skor sesuai dengan tingkat keparahannya.

1. Skor 1 untuk tingkat keparahan kecil (sel endothelia sedikit mengalami kerusakan, tapi masi tetap teratur).
2. Skor 2 untuk tingkat keparahan sedang, kontinitasnya sudah terputus, bentuknya tidak teratur dan mulai terjadi penumpukan lemak.
3. Skor 3 untuk tingkat keparahan besar lapisan sel endothelia kontinitasnya tidak jelas lagi , bentuknya tidak teratur, terjadi penumpukan lemak serta terjadi proliferasi dari sel otot polos. Kemudian hitung rata-rata pada setiap perlakuan.

Analisa Data

Semua data diolah dengan menggunakan SPSS statistics 17.0. data perkembangan diameter lumen arteri koroner dan besarnya kerusakan sel endothelia dan sel otot polos arteri koroner dianalisa secara statistik dengan ANOVA 1 arah dan dilanjutkan dengan uji Duncan. Kebermaknaan diambil pada $P < 0,05$ (Jones, 2010).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Setelah dilakukan penelitian tentang uji efek ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap aterosklerosis pada arteri koroner pada burung puyuh jantan, maka diperoleh hasil sebagai berikut:

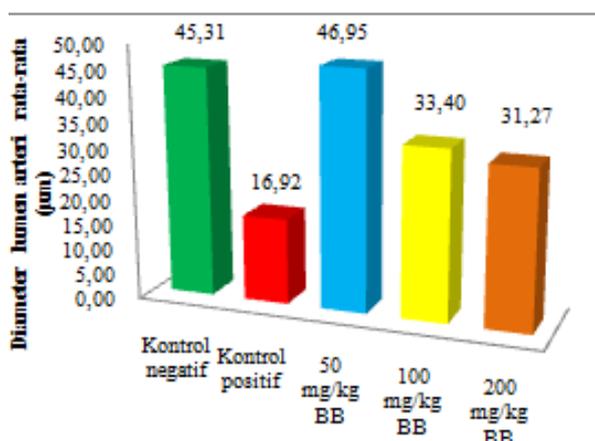
1. Diameter lumen arteri koroner
Hasil pengukuran diameter lumen arteri koroner rata-rata hewan kontrol negatif; positif; dosis 1; dosis 2; dosis

3 secara berturut-turut adalah: 45,31 μm ; 16,92 μm ; 46,95 μm ; 33,40 μm ; 31,27 μm . Dosis 50 mg/kg BB lebih mendekati dengan kontrol negatif dibandingkan dosis 100 mg/kg BB dan dosis 200 mg/kg BB, ini menunjukkan dosis 50 mg/kg BB baik dalam mencegah terjadinya aterosklerosis.

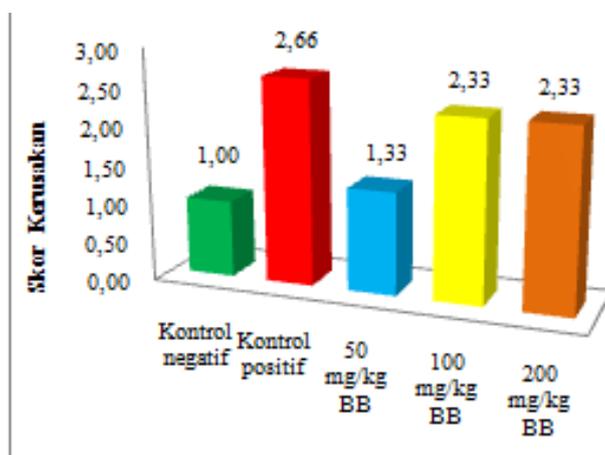
2. Tingkat kerusakan sel endotel.

Jumlah kerusakan sel endotel hewan kontrol negatif; positif; dosis 1; dosis 2; dosis 3 secara berturut-turut adalah 1,00; 2,66; 1,00; 1,33; 1,66. Tingkat kerusakan pada dosis 50 mg/kg BB tidak memperlihatkan jumlah kerusakan yang banyak dibandingkan dengan dosis 100 mg/kg BB dan dosis 200 mg/kg BB.

Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang sudah dilakukan identifikasi tanaman di herbarium Universitas Andalas Jurusan Biologi FMIPA. Digunakan simplisia daun sirsak yang telah dilakukan uji susut pengeringan sebesar 8,7704 %. Ekstraksi dilakukan dengan metoda maserasi, hal ini dilakukan karena metoda ini lebih sederhana, tidak memerlukan peralatan khusus dan tidak memerlukan pemanasan sehingga dapat mengatasi kemungkinan adanya senyawa yang terurai atau menguap akibat pemanasan. Ekstrak kental daun sirsak yang didapat dibuat menjadi 3 variasi dosis yaitu 50 mg/kg BB, 100 mg/kg BB dan 200 mg/kg BB, kenaikan dosis bertujuan untuk memperjelas efek dari obat.



Gambar 1. Diagram skor kerusakan sel endotel arteri koroner burung puyuh jantan setelah diberikan perlakuan selama 60 hari



Gambar 2. Diagram batang skor kerusakan sel endotel arteri koroner burung puyuh jantan setelah diberikan perlakuan selama 60 hari

Hewan percobaan yang digunakan adalah burung puyuh jantan karena hewan percobaan ini sering digunakan dalam pengujian aterosklerosis, selain itu burung puyuh memiliki kerentanann yang sangat tinggi terhadap pembentukan aterosklerosis dan terjadinya lesi aterosklerosis yang menyerupai lesi aterosklerosis yang terjadi pada manusia. Selain itu diameter arteri koroner burung puyuh besar sehingga mudah untuk melihat proses pembentukan aterosklerosis. Hewan diinduksi selama 60 hari sebab pertumbuhan aterosklerosis pada burung puyuh jantan terjadi setelah 2-3 bulan. Burung puyuh jantan dipilih

karena diketahui pada manusia dimana pria lebih beresiko terkena aterosklerosis dibandingkan wanita. Hal ini disebabkan wanita memiliki hormon estrogen yang dapat menurunkan kadar kolesterol darah sehingga dapat mencegah terjadinya aterosklerosis. Penginduksi yang digunakan sebagai pembentuk aterosklerosis pada hewan percobaan adalah makanan lemak tinggi dengan komposisi makanan standar burung puyuh, lemak sapi dan kuning telur dan propiltiourasil.

Pembuluh darah burung puyuh yang diamati dalam penelitian ini adalah arteri koroner karena aterosklerosis sering

terjadi pada arteri koroner dibanding aorta dan arteri-arteri serebrum. Setelah pemberian ekstrak daun sirsak, makanan lemak tinggi dan propiltiourasil pada burung puyuh yang diberikan secara oral setiap hari selama 2 bulan, kemudian hewan percobaan dikorbkan dengan cara di diskolasi lehernya dan organ jantung diambil dan dilakukan pemeriksaan lesi aterosklerosis.

Setelah dianalisa pada kelompok hewan pada dosis 50 mg/kg BB memperlihatkan efek yang mendekati kontrol negatif dibandingkan dengan kelompok hewan kontrol positif, terlihat tunica intima yang utuh, tidak terdapat sumur-sumur dan tidak terjadi proliferasi sel otot polos. Pada hewan kontrol positif terlihat lumen yang sempit akibat penebalan dinding arteri koroner dan proliferasi otot polos terdapat banyak sumur-sumur karena terjadi kerusakan tunica intima dilakukan perhitungan statistik dengan ANOVA 1 arah, kelompok hewan kontrol negatif memperlihatkan lebih besar diameter lumen arteri koronernya dibandingkan kontrol positif. Kelompok dosis 50 mg/kg BB menunjukkan peningkatan diameter lumen jika dibandingkan dengan kontrol positif. Jadi yang memberikan efek terapi terhadap aterosklerosis adalah dosis 50 mg/kg BB ini dibuktikan dengan diameter lumen arteri lebih besar mendekati kontrol negatif.

Skor tingkat kerusakan sel endotel pada kelompok kontrol negatif tidak berbeda nyata dengan kelompok dosis 50 mg/kg BB, sedangkan kontrol positif tidak berbeda nyata dengan kelompok dosis 100 mg/kg BB dan 200 mg/kg BB. Ini menunjukkan kelompok dosis 50 mg/kg BB memberikan efek dalam mengurangi kerusakan sel endotel arteri.

Setelah dilakukan uji efek ekstrak daun sirsak terhadap aterosklerosis pada arteri koroner burung puyuh jantan, kelompok dosis 50 mg/kg BB dinyatakan dapat mencegah terjadinya perkembangan aterosklerosis. Kelompok dosis 100 mg/kg

BB dan dosis 200 mg/kg BB menunjukkan tidak ada perbedaan antara kelompok yang diberikan ekstrak daun sirsak dengan kelompok kontrol positif, mungkin disebabkan dosis terlalu besar maka dosis harus diturunkan.

KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Pemberian ekstrak daun sirsak dapat mencegah terjadinya aterosklerosis yang diinduksikan dengan makanan lemak tinggi dan propiltiourasil.
2. Pemberian ekstrak daun sirsak dengan dosis 50 mg/kg BB memberikan efek yang paling baik dalam mencegah terjadinya aterosklerosis.

DAFTAR PUSTAKA

- Champy, P., Melot, A., Guerineau, E.V., Gleye, C., Fall, D., Hoglinger, G.U., Ruberg, M., Lannuzel, A., Laprevote, O., Laurens, A., Hocquemiller, R. (2005). Quantification of acetogenins in *Annona muricata* linked to atypical parkinsonism in guadeloupe. *Mov. Disord.* 20, (12), 1629-1633.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2008). *Farmakope Herbal Indonesia*. (Edisi I). Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Gajalakshmi, S., Vijayalakshmi, S., Rajeswari, D.R. (2011). Phytochemical and pharmacological properties of *Annona muricata*: a review. *In. J. Pharm & Pharm Sci.* 4, (2), 3-6.
- George, V.C., Kumar, D.R. N., Rajkumar, V., Suresh, P.K., Kumar R.A. (2012). Quantitative assessment of the relative antineoplastic potential of the n-butanolic Leaf

- extract of *Annona muricata* L. in normal and immortalized human cell lines. *Asian. Pac. J. Cancer. Prev.* 13, (2), 699-704.
- Hasnawati, E. (2012). *Keajaiban sirsak menumpas penyakit*. Yogyakarta: Easymedia.
- Hasrat, J.A., De, B.T., De, B.J.P., Vauquelin, G., Vlietinck, A.J. (1997). Isoquinoline Derivatives Isolated from the Fruit of *Annona muricata* as 5-HTergic 5-HT_{1A} Receptor Agonists in Rats: Unexploited Antidepressive (Lead) Products. *J. Pharm. Pharmacol.* 49, (11), 1145-1149.
- Jones, D.S. (2010). *Statistik farmasi*. Penerjemah: Harrizul Rivai. Jakarta: EGC.
- Leeson, C.R., Leeson, T.S., Paparo, A.A. (1989). *Buku ajar histologi*. (Edisi V). Penerjemah: Staf Ahli Histopatologi FKUI. Jakarta: EGC.
- Nwokocha, C.R., Owu, D.U., Gordon, A., Thaxter, K., Mccalla, G., Ozolua, R.I., Young, L. (2012). Possible mechanism of action of the hypotensive effect of *Annona muricata* (soursop) in normotensive Sprague-dawley rats. *Pharm. Biol.* 50, (11), 1436-1441.
- Osorio, E., Arango, G.J., Jimenez, N., Alzate F., Ruiz G., Gutierrez, D., Paco, M.A., Gimenez, A., Robledo, S. (2007). Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. *J. Ethnopharmacol.* 111, (3), 630-635.
- Padma, P., Pramod, N.P., Thyagarajan, S.P., dan Khosa, R.L. (1999). Effect of the extract of *Annona muricata* and *Petunia nyctaginiflora* on herpes simplex virus. *J. Ethnopharmacol.* 61(1),81-83.
- Posangi, I., Posangi, J., Wuisan, J. (2012). *Efek ekstrak daun sirsak (Annona muricata L) pada kadar kolesterol total tikus wister*. Sekretariat PAAI- Bagian Anatomi Histologi.
- Price, S.A. & Wilson, M. L. (1995). *Patofisiologi: konsep klinis proses-proses penyakit*. (Edisi IV). Penerjemah: Peter Anugerah. Jakarta: EGC.
- Sausa, O.V., Vieira, G.D., Pinho, J.J., Yamamoto, C.H., Alves, M.S. (2010) Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of *Annona muricata* L. Leaves in animal models. *Int. J Mol. Sci.* 11, 2067-2078.
- Vogel. H.G. (2002). *Drug discovery and evolution*. Verlag Berlin Heidelberg New York : Springer.